

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-153952

(43)Date of publication of application : 03.06.1994

(51)Int.Cl.

C12N 15/10

C12M 1/00

C12Q 1/68

(21)Application number : 04-341454

(71)Applicant : TAMAMAKI NOBUAKI

(22)Date of filing : 26.11.1992

(72)Inventor : TAMAMAKI NOBUAKI

(54) METHOD FOR PRETREATMENT FOR CARRYING OUT AMPLIFYING AND LABELING OF UNKNOWN DOUBLE-STRANDED DNA MOLECULE IN TRACE AMOUNT

(57)Abstract:

PURPOSE: To enable the amplification of an unknown DNA in a test tube by finely dividing the unknown DNA molecules with plural specific restriction enzymes and then binding an adaptor to the terminal of the DNA molecules of various sizes.

CONSTITUTION: Unknown DNA are made to react with plural kinds of restriction enzymes capable of recognizing the base pairs in the course of a DNA chain and preparing a cohesive end and finely divided. An adaptor of a suitable size is then bound to the resultant cohesive end to enable the amplification in a test tube by using a primer for the known region prepared in the unknown DNA molecule terminal.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Best Available Copy

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-153952

(43)公開日 平成6年(1994)6月3日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/10				
C 1 2 M 1/00	A			
C 1 2 Q 1/68	Z	7823-4B		
		8931-4B	C 1 2 N 15/ 00	A

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全 8 頁)

(21)出願番号 特願平4-341454

(22)出願日 平成4年(1992)11月26日

(71)出願人 392033783

玉巻 伸章

福井県勝山市北郷町桧曾谷8-4甲

(72)発明者 玉巻 伸章

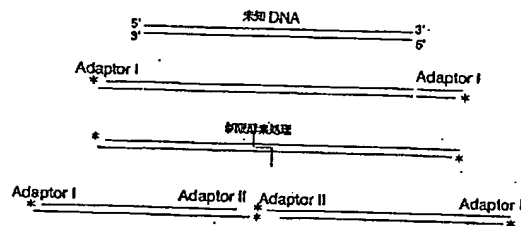
福井県勝山市北郷町桧曾谷8-4甲

(54)【発明の名称】 微量未知二重鎖DNA分子の増幅、標識を行うための前処理方法

(57)【要約】

【目的】 これまで、微量しか得られない未知DNAを、試験管内で増幅することは不可能であった。本申請の目的は、全く未知のDNA分子が微量しか獲られず、かつ様々なサイズの分子の混合液として存在するとき、その全体を試験管内で増幅することを可能にする準備の方法を確立することにある。加えて、DNA複製の時に標識モノマー（標識dNTP）を用いる場合、既知のプライマーを使った標識法を提供することにある。

【構成】 本発明の基本的方針は、ハイブリダイゼーション法に使用可能な範囲で、分注した未知DNA分子を2種の制限酵素でそれぞれ細分化し、様々なサイズのDNA分子それぞれにの端にアダプターを結合し、既知の塩基配列を作ることにある。DNAの増幅、標識は、アダプターを合成する際に混ぜ合わせた2種のオリゴヌクレオチドの一方が、リバース、フォワードの両方のプライマーとして働く。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 微量にしか得ることの出来ない、未知二重鎖DNA分子の両端を、酵素処理により平滑末端とし、適切な大きさのアダプターを結合して、分子両端部に既知領域を作る。含まれる高塩基数DNA分子については細分化する目的で、2種以上の、DNA鎖途中の4塩基対を認識し粘着末端を作る制限酵素で、分注した溶液中のDNAをそれぞれ切断し、その粘着末端に結合できる適切な大きさのアダプターを結合して分子両端部に既知領域を作る。この未知DNA分子末端に作られた既知領域に対するプライマーを用い、既存のDNA試験管内増幅法を活用できるように準備する方法。

【請求項2】 微量にしか得ることの出来ない、未知二重鎖DNA分子の両端の3'端に、同種塩基を重合させる酵素を用い、分子両端部に既知領域を作る。以降【請求項1】の制限酵素処理以下の操作をする方法。

【請求項3】 【請求項1】【請求項2】にある方法で、DNA分子両端部に既知領域を作り、既知領域に対するプライマー及び標識モノマー（標識dNTP）を用いて、未知二重鎖DNAを標識する方法。

【請求項4】 微量未知DNA分子を増幅する準備をするキットであって、(A) 未知DNAの平滑末端に結合するためのアダプター一種を入れたコンテナ、(B) 結合試薬を入れたコンテナ、(C) 2種の粘着末端を作る制限酵素を入れたコンテナ、(D) 制限酵素によって出来た粘着末端に結合するアダプターを入れたコンテナ、(E) 上記のアダプターを構成し、増幅反応や、標識反応のときのプライマーになるオリゴヌクレオチドを入れたコンテナ、少なくとも以上のものを有するパッケージタイプの多コンテナ型ユニットから成るキット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 いまDNAを扱う分子生物学の応用範囲は、日々広がり、医学分野の病名診断を始め、様々な医学基礎研究においても重要な位置を占めている。他に、理学、農学、薬学、微生物工学、挙げれば枚挙に暇が無い。本申請が関わる研究手法には、ハイブリダイゼーション法や微量DNAのクローニングと呼ばれるものが考えられるが、いずれもDNA分子生物学で最も頻繁に用いられる手法で、上記のいずれの分野に於いても、常に用いられているものである。

## 【0002】

【従来の技術】 DNAの遺伝情報は、ATCGの塩基の配列に符号化されている。それ故DNA分子の研究は、同じ配列ないしは似通った配列があるかどうかを比較する研究手段が、頻繁に用いられる。この配列を比較する方法の総称をハイブリダイゼーション法という。ハイブリダイゼーション法に用いる標識プローブは既知の物を使うのみならず、未知のDNAないしRNAを用いるこ

とが、往々にある。この時標識プローブは、多量に準備できるものであるなら問題はないが、一度に限られた量しか得られないときには、再度標識プローブを得るために多くの手順を繰り返すことが必要であった。一度きりしか資料が得られない場合には、標識プローブを使い果たせば、それ以降の操作は不可能となっていた。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】 現在では、既知の塩基配列が二カ所にあれば、米国特許 No. 4,683,195 及び No. 4,683,202（日本では特開昭61-274697号公報及び特開昭62-281号公報にて公開中）の方法（PCR反応）で、2000bpぐらいまでならばその間の部分のDNAは試験管内で増幅が可能である。しかし微量しか得られない全く未知のDNAを、試験管内で増幅することは不可能であった。本申請中の発明は、ハイブリダイゼーション法に使用可能な範囲でDNA分子を細分化するものの、そして存在比率は維持できないかも知れないが、全く未知のDNAを試験管内で増幅することを可能にするものである。その結果として、ある細胞からその細胞内で発現している遺伝子のライブラリーを作るとき、わずかしが発現していない遺伝子をクローニングするのは難しいが、発現遺伝子のcDNAを本発明をもちいて増幅することで、クローニング出来る可能性を高める。さらに、DNA複製の時に標識モノマー（標識dNTP）を用いるならば、ファインバーグとボウゲルスタインの方法、Anal Biochem 132 巻6-13頁にあるランダムプライマー標識法以上に効率よく標識出来る、既知のプライマーを使った標識法を提供するものである。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明は、全く未知のDNA分子が微量しか得られず、かつ様々なサイズの分子の混合液として存在するとき、その全体を試験管内で増幅することを可能にする準備手段であり、その基本的方針は、様々なサイズの未知DNA分子それぞれに対応して、既知の塩基配列を付加するところにある。

(A) まず未知二重鎖DNA分子の断端は、平滑末端である保証がないので、酵素処理により、陥没した領域にはDNAモノマーを付加し、突出した領域は一部削り取って、全ての断端を平滑にする。

(B) 65℃ 15分程度熱処理やフェノールクロロホルム処理により、(A)の反応を止め、DNAを回収する。

(C) 次に、平滑末端に結合できるアダプター（【実施例1】に実例あり）を加え、T4リガーゼの作用により、結合する。

(D) アダプターを結合したDNA溶液を3分注する。ひとつは、そのままポリアクリルアミドゲルの電気泳動に掛けゲルを切り出すか、分子ふるいのカラムに掛け、例えば500bp以上のDNA分子を精製する。

(E) 残り2つの分注分は、4塩基対を認識し粘着末端を作る2種の制限酵素で、それぞれを処理する。

(F) それぞれの粘着末端に結合できるアダプター（〔実施例2〕に実例あり）を加え、断片化した未知DNAの両端に結合する。もとの断端には、既にCの項の所に記載された処理で、アダプターが結合されている（図1）。

(G) アダプターを結合した2つの分注分は、ポリアクリルアミドゲルの電気泳導に掛けゲルを切り出すか、分子ふるいのカラムに掛け、例えば500bp以上のDNA分子を精製する。

(H) 高塩基数DNA分子の濃度を十分に高くし、米国特許 No. 4, 683, 195 及び No. 4, 683, 202（日本では特開昭61-274697号公報及び特開昭62-281号公報にて公開中）の方法（PCR反応）を用いて、DNAの増幅を行う。

(H) 高塩基数DNA分子の濃度を十分に高くすることで、PCR反応を用いて、DNAの増幅を行っても、低塩基数のDNAのみが増幅され、高塩基数のDNA分子は確認もできないと言うことは起こらない。

【0005】本発明の中では、様々な酵素が使われている。例えば制限酵素というのは、二重鎖DNAを特定の塩基配列を認識して切断する細菌性酵素のことである。T4ポリメラーゼというのは、Panet et al. Biochemistry 12巻5045-5050 頁にあるように、二重鎖DNA末端を平滑化するのに効果的に働き、E. coli DNAポリメラーゼ・クレノー断片も Klenow et al. Eur. J. Biochem 45巻371 頁にあるように、平滑化に働くほか、DNA複製に働く。このような酵素は、何れも、安価にて入手可能なものである。更に本発明の中で使われる、プライマーも、ビューページとカルサーズ法（Tetrahedron Letters 22巻1859-1862頁 1981年）に従って、多孔ガラス担体を固着カラムとして合成することが可能である。アダプターも、相補的なオリゴヌクレオチドを加熱し徐々に冷却することで、調整することが出来る。

【0006】発明が解決しようとする課題の項目中に、PCR法では既知の塩基配列が二カ所にあれば、2000bpぐらいまでならばその間の部分のDNAは試験管内で増幅が可能であるとは書いたが、本発明の基本的方針にある、様々なサイズの未知DNA分子それぞれに対応して、既知の塩基配列を付加した場合には必ずしも当てはまらない。2000bpまでも増幅可能なのは、テンプレートになるDNA（2種のプライマーが相補的に結合できる元のDNA分子）が、DNA混液中に一カ所ないしは2〜3カ所に限られているときである。PCR反応で幾つもの増幅されたDNAのバンドが電気泳導すると認められる例がよく示されるが、プライマーの相補性が高い領域が複数個ある場合である。本発明にあるように、プライマーが結合する領域が多数ある場合は大きく状況が異なる。まず、2000bpぐらいまでのDNA分子が増幅されていたものが、500bpを越える領域のDNA分子から増幅されにくくなり、1000bp以上では不可能と思われる。これは小さなDNA分子から大きなものまで、全てが同

じプライマーに相補的な領域を両端に有し、プライマーや基質を競い合うとき、小さなDNAが有利になり増幅され易いためと考えられる。それ故、制限酵素による断片化とアダプター結合の後、例えば500bp以上のDNA分子をアクリルアミドゲルで精製することにより、高塩基数のテンプレートになるDNAの濃度を上げた（ゲル電気泳導による精製の精度は、米国特許No. 4, 683, 195 日本では 特開昭61-274697号公報にあるPCR反応による検出精度より遥かに低い）。もし低塩基数領域中にあるわずかのDNAが失われるのを恐れるなら、例えば500bp以下も精製してPCR反応を行えば良いが、高塩基数領域のDNAはほとんど増幅されない。例えば500bp以上を精製してPCR反応を行えば、高塩基数領域に加え、低塩基数領域も同時に増幅されてくる。

【0007】米国特許 No. 4, 683, 195 及び No. 4, 683, 202（日本では特開昭61-274697号公報及び特開昭62-281号公報にて公開中）の方法（PCR反応）では、プライマーは、リバースとフォワードのそれぞれは、違ったものとして取り扱われていた。しかし、これは違った配列である必要はなく、全く同じ物であっても構わないことが分かり、本発明の中で利用されている。プライマーが安定に相補的DNA分子に付く温度のことを、アニーリング温度と言うが、これはGC含量に大きく依存する。塩基配列が違えばこの温度も異なる。しかしプライマーがリバースとフォワードとも同一であると、同一の温度で二カ所に安定した相補的結合を作るので、理想的である。適切なアダプター（実施例3では図3のアダプターIIIやアダプターIV）を未知DNAの制限酵素処理前の両端に結合するものに用いると、プライマーは（図1の星印の付いた部分）一種類で、全てに対応するように仕組むことが、可能である。

【0008】

【作用】本申請中の発明は、ハイブリダイゼーション法に使用可能な範囲でDNA分子を細分化するものの、全く未知のDNAを試験管内で増幅することを可能にする。ハイブリダイゼーション法に使用するプローブは、様々な大きさのDNAを用いることが可能であるが、低塩基数のDNAで遺伝子を検出するのに十分役立ち、高塩基数のDNAであればあるほど扱いが難しくなる。組織中のDNA分子を検出するのに用いる、インサイチュウハイブリダイゼーション法では、50-200bpぐらいが望ましい。それ故、4塩基対を認識して切断する制限酵素で処理することにより、DNA分子の256bp（4の4乗）に一カ所の確率で切断されるので、非常に都合のいいサイズの分子が得られる。大きすぎるサイズや、小さすぎるサイズに切断される部分が出るが、2種類の4塩基対を認識して切断する制限酵素で、分注したそれぞれを処理すると、相補的に補い合うので、大きなDNA分子であってもその塩基配列のほとんどの部分は、ハイブリダイゼーション法で検出する対照とすることが出来

る(実施例2を参照)。最終的に一つの目的とするDNA分子が、本発明の処理を経たものから見つかったなら、遺伝子全体の塩基配列はcDNAライブラリーから再クローニングすることで知ることが出来る。それ故4塩基対を認識して切断する制限酵素で処理することは、本発明の利点となっても、欠点とはならない。更に、ある細胞からその細胞内で発現している遺伝子のライブラリーを作るとき、わずかししか発現していない遺伝子をクローニングするのは難しいが、発現遺伝子のcDNAを本発明を用いて増幅することで、代わりにそのcDNAの一部をクローニングする可能性を高める。

【0009】本発明は、全く未知のDNA分子が微量しか獲られず、かつ様々なサイズの分子の混合液として存在するとき、存在比率は維持できないかも知れないが、その全体を試験管内で増幅することを可能にした。さらにDNA複製の時に標識モノマー(標識dNTP)を用いるならば、効率よく標識出来る、既知のプライマーを使った標識法を提供するものである。

【0010】

【実施例1】本実験は、低塩基数DNAの平滑末端にそのままアダプターを結合する場合でも、本特許申請内容が有効に働くことを示すために行った。模擬実験として、バクテリオファージΦX174DNAを制限酵素HaeIIIで切断したものを、未知DNA分子と見なし、アダプターI(図3)をファージDNAの平滑末端に、T4リガーゼを作用させることにより、結合した。ファージDNAの液にアダプターIを0.1μM以下ではあるが、ファージDNA濃度よりは十分に高い濃度になるように加える。この混合液にT4リガーゼを加え、アダプターとファージDNA断片を結合する。このリガーゼによる結合では、アダプター合成の際に、5'末端側に磷酸基を付けていないので、アダプター同士は同じ平滑末端を介しても結合することはない。

【0011】バクテリオファージΦX174DNAを制限酵素HaeIIIで切断したものは、(1:353 1,078 872 603 310 281 271 234 194 118 72)の塩基数である。アダプターIは、(化1、化2)の2つのオリゴデオキシリボヌクレオチドより合成した。

【0012】

【化1】

5' AATTCCGGCGCGCGCGCATCC 3'

【0013】

【化2】

5' GATCCGGCGCGCGCGAATT 3'

【0014】オリゴヌクレオチド合成法

ビューケージとカルサース法(Tetrahedron Letters 22巻1859-1862頁1981年)に従って、多孔ガラス担体を固層カラムとして合成した。カラムからは、30%水酸化アンモニウム溶液を注入し反応させ、カラムから生成物を遊離させ、55℃で、一晚反応を進め、保護基を外す。濃

縮、沈殿、精製の処理後、260 nmの紫外光吸収度により、その濃度を算出する。

【0015】アダプターの合成法

精製されたオリゴヌクレオチド(化1)と(化2)の溶液を等モル数ずつ混合し、一度95℃にまで加熱し、その後緩やかに温度を室温にまで下げる。この段階で、オリゴヌクレオチド(化1)と(化2)は互いにハイブリダイズし、二重鎖構造を持ったアダプターIが調製される。

【0016】アダプターIを結合したΦX174DNAの混合物を、8%ポリアクリルアミドゲル電気泳動に掛けることにより、500bp以上のDNA分子を精製した。増幅のための準備が出来たかどうかを確かめる目的で、米国特許 No. 4,683,195及び No. 4,683,202(日本では特開昭61-274697号公報及び特開昭62-281号公報にて公開中)の方法(PCR反応)で、精製前後のΦX174DNAをテンプレートとし、(化2)をプライマー、DNA合成酵素にはT7ポリメラーゼ(高度好熱菌DNAポリメラーゼ)を用いて、増幅反応を試験管内で行った。テンプレートDNAには、非磷酸化5'末端を持つアダプターを結合し、ニックが入ったままの状態にあるので、PCR反応サイクルには72℃で1分間ポリメラーゼ反応により、ニックを除くステップを始めにおいた。

【0017】反応によって生成されたDNAを8%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、増幅の程度を確かめた(図2レーン2、3)。その結果、500bp以上のDNA分子を精製してテンプレートとしたものでは、500bp以上のDNA分子も増幅されていたが、500bp以下のDNA分子も効率よく増幅されていた。アクリルアミドゲルによる精製では、上記増幅反応でも増幅されないほどに精度高く500bp以下のDNA分子を除去出来なかったと考えられる。

【0018】実施例1により、1000bp以下の二重鎖DNA分子であるなら、両端にアダプターIを結合し、PCR反応に供する500bp以上のテンプレートDNA分子濃度を精製して高めることで、全体に均一ではないが増幅可能であり、本特許申請内容の一部が、PCR増幅反応の前処理として有効に働くことが示された。

【0019】

【実施例2】本実験は、高塩基数DNAを制限酵素で、細分化した際にも、本特許申請内容が有効に働くことを示すために行った。模擬実験として、pUC19プラスミッドDNAを未知DNA分子と見なし、制限酵素Sau3AIないしはHapIIで切断し、アダプターII(図3)をDNAの粘着末端に、T4リガーゼを作用させることにより、結合した。

【0020】pUC19プラスミッドDNA(2,686bpの環状DNA)を、制限酵素Sau3AIないしはHapIIで切断したものは、

Sau3AI : 955 585 341 258 141 105 78 75 46

36 18 17 12 11 8  
 HapII : 501 489 404 331 242 190 147 111 1  
 10 67 34 34 26  
 の様な、それぞれ14本と12本の二重鎖DNA分子に分かれる。このうち、100bp以下の大きさのDNA分子は、ハイブリダイゼーション法のプローブとしても、クローニングする対象物としても小さすぎる。しかし元のDNAを含む溶液を、二分注しておき、一方をSau3AIで、他方をHapIIで切断するならば、相補的に一方では、100bp以下の分子に切断される部分も、他方では100bp以上の分子内に含まれ、ハイブリダイゼーション法のためのプローブなどに使用することが出来る。pUC19 DNA分子2686bpのうち、いずれの制限酵素処理でも100bp以下のDNA分子中に含まれてしまう部分はなかった(図4)。

【0021】ここで用いたアダプターは、図3に記したが、一方の端が、Sau3AIの切断に依って出来る粘着末端に相補的な配列の突出があり、他方の端はHapIIの切断に依って出来る粘着末端に相補的な配列の突出がある。さらにこのアダプター内部にNotIの認識部位があるので、アダプター結合がクローニングの際にも役立つ。さらに米国特許 No. 4,683,195 及び No. 4,683,202 (日本では特開昭61-274697号公報及び特開昭62-281号公報にて公開中)の方法(PCR反応)で増幅したときには、制限酵素 EcoRIの認識部位も出来るように工夫されている(図3)。アダプターIIは、(化3、化4)の2つのオリゴデオキシリボヌクレオチドより合成した。

【0022】

【化3】

5' CGAATTCCTTAGCGGCCGAG 3'

【0023】

【化4】

5' GATCCTGCGGCCGCTAAGAATT 3'

【0024】精製されたオリゴヌクレオチド(化3)と(化4)の溶液を等モル数量ずつ混合し、一度95℃にまで加熱し、その後緩やかに温度を室温にまで下げる。この段階で、オリゴヌクレオチド(化3)と(化4)は互いにハイブリダイズし、二重鎖構造を持ったアダプターIIが調製される。

【0025】HapIIによる切断の場合は、未知DNAはアダプターIIのHapII用粘着末端側で両側に結合する。Sau3AIによる切断の場合は、未知DNAはアダプターIIのSau3AI用粘着末端側で両側に結合する(図3)。PCR反応の際に必要なプライマーは、HapIIによる切断の場合は、どちらの方向の複製も(reverse and forward)同一のプライマー(化4)が働く。Sau3AIによる切断の場合は、どちらの方向の複製にも、同一のプライマー(化3)が働く。米国特許 No. 4,683,195 及び No. 4,683,202 (日本では特開昭61-274697号公報及び特開昭

62-281号公報にて公開中)の方法(PCR反応)では、双方向の複製に働くプライマーは、それぞれ異なったものとして記載されていたが、同一のものであってもその増幅の効率は変わらないと思われた。増幅されたDNAは、8%ポリアクリルアミドゲルに掛けて、図2のレーン4~8に示す(図2)。

【0026】テンプレートDNAには、非燐酸化5'末端を持つアダプターを結合し、ニックが入ったままの状態にあるので、PCR反応サイクルには72℃で1分間ポリメラーゼ反応により、ニックを除くステップを始めにしていた。

【0027】

【実施例3】実際に、未知DNA混合液で、実施例1、実施例2を組み合わせ、増幅実験を行った。ラットの脳の一領域を切り出し、この部分からmRNAを抽出して、cDNAを合成した。mRNAの抽出はPharmacia P-L Biochemicals, Analects1988 16巻1-にある方法に従い、cDNAの合成は Gubler & Hoffman Gene, 25 巻 263-269頁の方法に従った。cDNAはRNA逆転写酵素により、mRNAにより合成され、RNA, DNAハイブリッドにRNase Hを作用させて切れ目を入れ、ポリメラーゼIとリガーゼにより二本鎖DNAにする、クレノーフラグメントによって、末端を平滑にし、続いてGubler & Hoffmanの方法では、両端にリンカーを付けるところを、代わりにアダプターI(図3)を結合した。アダプターを0.1μM以下ではあるが、未知DNA濃度よりは十分に高い濃度になるように加える。この混合液にT4リガーゼを加え、アダプターと未知DNA断片を結合する。このリガーゼによる結合では、アダプター合成の際に、5'末端側に燐酸基を付けていないので、アダプター同士は同じ平滑末端を介しても結合することはない。

【0028】アダプターIの代わりに、制限酵素Sau3AIで切断する分注分には、アダプターIII、HaeIIIで切断する分注分には、アダプターIV(図3)を結合すると、PCR反応の際のプライマーを一種類にすることが出来る。

【0029】4分注して、一つは保存し、一つはポリアクリルアミドゲルにかけて電気泳動し500bp以上のサイズのDNAと以下のサイズのものに分離した。

【0030】残り二つの1/4量は、一方はSau3AIで他方はHaeIIIという二種類の制限酵素でDNA分子を切断した。そして、それぞれの液にアダプターII(図3)を0.1μM以下ではあるが、未知DNA濃度よりは十分に高い濃度になるように加える。この混合液にT4リガーゼを加え、アダプターと未知DNA断片を結合する。このリガーゼによる結合では、アダプター合成の際に、5'末端側に燐酸基を付けていないので、アダプター同士は相補的な粘着末端を介しても結合することはない。

【0031】アダプターを結合した未知DNAは、ポリ

アクリルアミドゲルにかけて電気泳動し500bp以上のサイズのDNAと以下のサイズのものに分離した。

【0032】それぞれの分注分で、直接及び、低塩基数DNA精製分、高塩基数DNA精製分から、PCR反応のテンプレートとして一部を取り、(化3)ないし(化4)をプライマーとしてPCR反応を行った。テンプレートDNAには、非リン酸化5'末端を持つアダプターを結合し、ニックが入ったままの状態にあるので、PCR反応サイクルには72℃で1分間ポリメラーゼ反応により、ニックを除くステップを始めにおいた。

【0033】PCR反応産物を再びポリアクリルアミドゲルにかけて電気泳動し500bp以上のサイズのDNAを得てテンプレートDNAとして使用することもできるが、できれば元の精製した溶液を使うことが望ましい。PCR反応を繰り返している間に、溶液に含まれる分子の多様性が失われて行くことが考えられるからである。

【0034】増幅された反応産物を、同じく8%ポリアクリルアミドゲルにかけて図5に示す。

【0035】

【発明の効果】【実施例1】から【実施例3】において示された様に、本申請中の発明は、ハイブリダイゼーション法に使用可能な範囲でDNA分子を細分化するものの、全く未知のDNAを試験管内で増幅することを可能にした。更に、ある細胞からその細胞内で発現している遺伝子のライブラリーを作るとき、わずかしが発現していない遺伝子をクローニングするのは難しいが、発現遺伝子のcDNAを本発明をもちいて増幅することで、代わりにそのcDNAの一部をクローニングする可能性を高める。

【0036】本発明は、全く未知のDNA分子が微量しか獲られず、かつ様々なサイズの分子の混合液として存在するとき、存在比率は維持できないかも知れないが、その全体を試験管内で増幅することを可能にした。さらにDNA複製の時に標識モノマー(標識dNTP)を用いるならば、効率よく標識出来る、既知のプライマーを使った標識法を提供するものである。

【図面の簡単な説明】

【図1】未知DNAを増幅するための準備過程の、総合した模式図。図にあるアダプターIとIIは、図3にその実際例を示す。星印を付けたオリゴヌクレオチドは、PCR増幅の際のプライマーとなる部分を示す。

【図2】実施例1、実施例2の準備処理後、PCR増幅を行ったDNA混液を、8%アクリルアミドゲルにて電気泳動したもの。左の数は塩基数(bp)を示す。アダプターを付け、高塩基数領域を精製したものをテンプレートDNAに用いたときに、より高塩基数領域まで増幅することが出来た。

レーン1：マーカー(バクテリオファージΦX174 DNAを制限酵素 HaeIIIで切断したもの)

レーン2：ΦX174 DNAを制限酵素 HaeIIIで切断したものにアダプターIを付け電気泳動で高塩基数領域を精製してPCR増幅を行ったDNA混液

レーン3：ΦX174 DNAを制限酵素 HaeIIIで切断したものにアダプターIを付け電気泳動せずにPCR増幅を行ったDNA混液

レーン4：pUC19プラスミッドDNAを、Sau3AIで切断したものにアダプターIIを付け、電気泳動で高塩基数領域を精製してPCR増幅を行ったDNA混液

レーン5：pUC19プラスミッドDNAを、Sau3AIで切断したものにアダプターIIを付け、電気泳動で低塩基数領域を精製してPCR増幅を行ったDNA混液

レーン6：pUC19プラスミッドDNAを、Sau3AIで切断したものにアダプターIIを付け、電気泳動せず直接PCR増幅を行ったDNA混液

レーン7：pUC19プラスミッドDNAを、Sau3AIで切断したものにアダプターIIを付け、電気泳動で高塩基数領域を精製してPCR増幅を行ったDNA混液

レーン8：pUC19プラスミッドDNAを、Sau3AIで切断したものにアダプターIIを付け、電気泳動で低塩基数領域を精製してPCR増幅を行ったDNA混液

【図3】実施例1、実施例2、実施例3にて使用した、アダプターの構造を示す図。破線の囲みは、制限酵素NotIの認識部位。

【図4】pUC19を、制限酵素Sau3AIないしはHaeIIIで切断した時の、制限酵素切断地図。pUC19 DNA分子2686bpのうち、いずれの制限酵素処理でも100bp以下のDNA分子中に含まれてしまう部分はなく、ハイブリダイゼーション法のための対象領域になり得ることを示す。

【図5】実施例3の準備処理後、PCR増幅を行ったDNA混液を、8%アクリルアミドゲルにて電気泳動したもの。左の数は塩基数(bp)を示す。何れの例でも、高塩基数領域を精製してPCR増幅したもので、相対的により高塩基数領域までの増幅がみられた。精製せずに直接PCR増幅したものと、低塩基数領域を精製してPCR増幅したものでは、相対的に同様の低塩基数領域のDNAが増幅されてきた。

レーン1：マーカー(バクテリオファージΦX174 DNAを制限酵素 HaeIIIで切断したもの)

レーン2：ラットの脳の一部から取ったmRNAより二重鎖cDNAを得て、アダプターIを付け、直接PCR増幅を行ったDNA混液

レーン3：同cDNAにアダプターIを付け、高塩基数領域(500bp以上)を精製してPCR増幅を行ったDNA混液

レーン4：同cDNAにアダプターIを付け、低塩基数領域(500bp以下)を精製してPCR増幅を行ったDNA混液

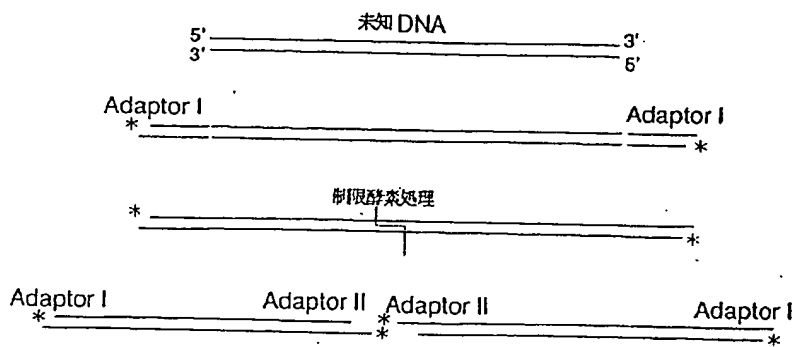
レーン5：同cDNAにアダプターIを付け、Sau3AI制限酵素処理をし、さらにアダプターIIを付け、直接PCR増幅を行ったDNA混液

レーン6：同cDNAにアダプターIを付け、Sau3AI制限酵

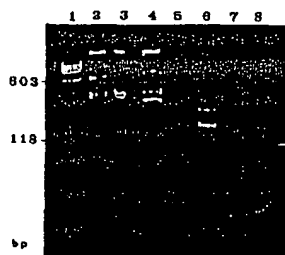
素処理をし、さらにアダプターIIを付け、高塩基数領域(500 bp以上)を精製してPCR増幅を行ったDNA混液  
 レーン7: 同cDNAにアダプターIを付け、Sau3AI制限酵素処理をし、さらにアダプターIIを付け、低塩基数領域(500 bp以下)を精製してPCR増幅を行ったDNA混液  
 レーン8: 同cDNAにアダプターIを付け、HapII制限酵素処理をし、さらにアダプターIIを付け、直接PCR増幅を行ったDNA混液

レーン9: 同cDNAにアダプターIを付け、HapII制限酵素処理をし、さらにアダプターIIを付け、高塩基数領域(500 bp以上)を精製してPCR増幅を行ったDNA混液  
 レーン10: 同cDNAにアダプターIを付け、HapII制限酵素処理をし、さらにアダプターIIを付け、低塩基数領域(500 bp以下)を精製してPCR増幅を行ったDNA混液

【図1】



【図2】



【図3】



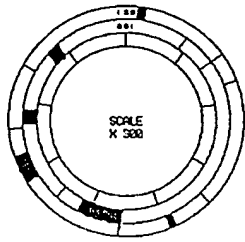


(8)

特開平6-153952

【図4】

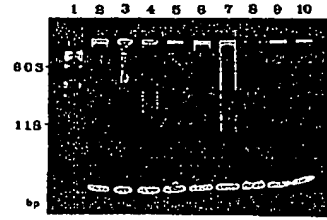
\*\*\* RESTRICTION ENZYME SITE \*\*\* NORMAL



1 - 2000

Strain:	2000
Enzyme:	NotI
123: NotI	13
201: SalI	15

【図5】



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**